

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 736 266**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **95 10049**

⑤1 Int Cl⁶ : A 61 K 38/17

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 24.08.95.

③0 Priorité : 05.07.95 KR 9519685.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 10.01.97 Bulletin 97/02.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : **MOGAM BIOTECHNOLOGY
RESEARCH INSTITUTE — KR.**

⑦2 Inventeur(s) : **IN CHEOL KANG, KWANG HOE
CHUNG, SOO JUNG LEE, DOO SIK KIM, HAK DAI
KIM, YUNG DAE YUN, JEONG HYEOK YOON et
HONG MO MOON.**

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : **CABINET PEUSCET.**

⑤4 **INHIBITEUR DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE ET PROCEDE POUR PREPARER CELUI-CI.**

⑤7 La présente invention fournit un nouveau peptide inhibant l'agrégation plaquettaire, à savoir la Salmosine et un procédé pour préparer celle-ci à partir du venin de Salmosa (*Agkistrodon halys brevicaudus*), une vipère coréenne. On prépare la Salmosine de la présente invention au moyen d'un procédé qui comprend les étapes consistant: à obtenir le venin de Salmosa; à charger le venin sur une colonne ayant traversé la colonne sans se lier; et à soumettre la solution à une série d'opérations, d'échange anionique, de filtration sur gel et de chromatographies CLHP en colonne à phase inverse. La Salmosine inhibe l'agrégation plaquettaire plus efficacement que tout autre peptide connu inhibant l'agrégation plaquettaire. On propose de développer la Salmosine en tant qu'agent thérapeutique pour la maîtrise de la thrombose.

	10	20	30	40
γ-Tyrosine	EAGED	CDGSS	PANPC	CDAAAT
(SEQ ID No 2)	CKLLP	GAQCG	EGLOC	DQCSF
Aspartate	QKRI	CDGSS	PENPC	CDAAAT
(SEQ ID No 3)	CKLRQ	GAQCG	EGLOC	EQQCF
Glutamine				SRAGK
CDGSS				QCE
(SEQ ID No 4)				SGPCC
Valine	EAGEE	CDGSS	PGNPC	CDAAAT
(SEQ ID No 5)	CKLRQ	GAQCA	EGLOC	DQCRF
Arginine	EAGEE	CDGSS	PGNPC	CDAAAT
(SEQ ID No 1)	CKLRQ	GAQCA	EGLOC	DQCRF
				MXKGT

	50	60	70
γ-Tyrosine	ICRRA	RGDOL	DOYCN
Kisline	ICRIP	RGDMP	DORCT
Aspartate	ICKRA	RGDOM	DOYCN
Valine	YCRRA	RGDOM	DOYCN
Salmosine	ICRRA	RGDOL	DOYCN

FR 2 736 266 - A1



2736266

1

INHIBITEUR DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE ET PROCÉDÉ POUR PRÉPARER CELUI-CI

Champ de l'invention

5 La présente invention a trait à un nouvel inhibiteur d'agrégation plaquettaire et à un procédé pour le préparer, de manière plus spécifique à un polypeptide inhibant l'agrégation plaquettaire et à un procédé pour le préparer à partir du venin de Salmosa (Agkistrodon
10 halys brevicaudus).

Arrière plan de l'Invention

Il est connu que le venin de vipère contient des peptides ou des protéines diverses, qui ont un effet sur
15 la thrombose et l'hémostase. La thrombose est d'une signification particulière, puisque les thrombus formés par l'hyperagrégation anormale de plaquettes peut conduire l'homme à la mort et à l'invalidité. A cet égard, on a isolé une diversité de peptides ou de
20 protéines inhibant ou activant l'agrégation plaquettaire à partir des venins de diverses espèces de vipères et on a caractérisé leurs propriétés biochimiques et biologiques.

Il a été aussi rapporté que l'agrégation
25 plaquettaire se produit par la fixation du fibrinogène à ses récepteurs spécifiques plaquettaires associés au complexe GPIIb-IIIa qui est une glycoprotéine sur la membrane de surface de plaquettes où la séquence d'acides aminés à Arg-Gly-Asp du fibrinogène est essentiellement
30 engagée (voir: Rouslahti et Pierschbacher, Science, 238: 491 à 497 (1987)). Naturellement on a suggéré que les peptides ou les protéines contenant la séquence d'acides aminés Arg-Gly-Asp soient capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire, basée sur l'interférence de la fixation de
35 fibrinogène aux récepteurs des plaquettes.

2736266

2

Au stade initial des recherches, les inhibiteurs de fixation du fibrinogène sur les récepteurs plaquettaires isolés à partir des venins de vipères avaient principalement été identifiés, comme étant des petites protéines de 5 à 9 kDa (voir: Huang et al., J. Biol. Chem., 262: 16 157 à 16 163 (1987)). Plus tard, on a également isolé, à partir des venins de diverses espèces de vipères, plusieurs inhibiteurs de masse moléculaire élevée. Tous les inhibiteurs définis ainsi jusqu'ici ont été caractérisés en tant que protéines riches en cystéine qui contiennent essentiellement la séquence d'acides aminés Arg-Gly-Asp pour la fixation spécifique du complexe GPIIb-IIIa sur les récepteurs plaquettaires.

On a récemment analysé, par spectrométrie RMN, les structures précises de quelques inhibiteurs d'agrégation plaquettaire tels que Kistrine (voir: Adler et al., Science, 253: 445 à 448 (1991); Adler et al., Biochemistry, 32: 282 à 289 (1993)), Flavoridine (voir: Klaus et al., J. Mol. Biol., 232: 897 à 906 (1993); Senn and Klaus, J. Mol. Biol., 232: 907 à 925 (1993)), Albolabrine (voir: Jaseja et al., Eur. J. Biochem., 218: 853 à 860 (1993)) et Echistatine (voir: Chen et al., Biochemistry, 30: 11 625 à 11 636 (1991); Cooke et al., Eur. J. Biochem., 202: 323 à 328 (1991); Cooke et al., Protein Eng., 5: 473 à 477 (1992); Saudek et al., Biochemistry, 30: 7369 à 7372 (1991); Dalvit et al., Eur. J. Biochem., 202: 315 à 321 (1991)). De plus, on a clairement démontré une interférence dans la fixation du fibrinogène au complexe GPIIb-IIIa par les inhibiteurs au moyen d'une expérimentation in vivo en utilisant un modèle animal (voir: Collen, J. Clin. Invest., 76: 101 à 108 (1985); Gold et al., Circulation, 77: 670 à 677 (1988); Yasuda et al., J. Clin. Invest., 81: 1 284 à 1 291 (1988);

2736266

3

Coller et al., Blood, 68: 783 à 786 (1986); Hanson et al., J. Clin. Invest., 81: 149 à 158 (1988)).

Dans ces circonstances, les présents inventeurs ont étudié 14 espèces de serpents coréens afin de dépister un
5 nouvel inhibiteur d'agrégation plaquettaire, et ils ont découvert qu'un petit polypeptide isolé à partir du venin d'une vipère coréenne, *Salmosa* (*Agkistrodon halys brevicaudus*), est un nouvel inhibiteur efficace d'agrégation plaquettaire qui n'a pas été rapporté
10 jusqu'ici.

Résumé de l'invention

Un but principal de l'invention est donc de fournir un nouveau peptide inhibant l'agrégation plaquettaire
15 provenant du venin de *Salmosa* (*Agkistrodon halys brevicaudus*).

L'autre but de l'invention est de fournir un procédé pour la préparation du polypeptide inhibant l'agrégation plaquettaire à partir du venin de *Salmosa*.

20

Brève description des dessins:

Ce qui précède et les autres buts et caractéristiques de la présente invention deviendront plus clairs grâce aux descriptions suivantes données
25 conjointement avec les dessins annexes, dans lesquels:

la figure 1 est une photographie montrant le spectre SDS-PAGE d'un peptide inhibant l'agrégation plaquettaire purifié à partir du venin de *Salmosa*;
30 la figure 2 est une liste des séquences amino-acides des peptides inhibant l'agrégation plaquettaire selon la présente invention (SEQ ID N°: 1) et selon l'état de la technique antérieure (SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4 et
35 SEQ ID N°: 5); et,

2736266

4

la figure 3 est un spectre de masse MALDI (Ionisation par désorption de matrice à l'aide de laser) du peptide inhibant l'agrégation plaquettaire selon l'invention.

5

Description détaillée de l'invention

Pour isoler l'inhibiteur de l'agrégation plaquettaire de l'invention, les présents inventeurs ont obtenu le venin de SALMOSA (Agkistrodon halys brevicaudus), une vipère coréenne. Puis, on a chargé le venin sur une colonne d'affinité à sérine protéinase afin de recueillir la solution ayant traversé la colonne sans se lier, et on a pratiqué une série d'opérations chromatographiques sur colonne, à savoir, échange anionique, filtration sur gel et chromatographies liquides à haute performance (CLHP) en colonne à phase inverse.

On a identifié le peptide inhibant l'agrégation plaquettaire (désigné dans la suite sous le nom "Salmosine") purifié comme ci-dessus, comme étant une petite protéine de masse moléculaire d'environ 7 500 Da, qui n'a pas été décrite jusqu'ici. La modélisation par ordinateur de la Salmosine, basée sur l'analyse des séquences d'acides-amino, enseigne que la structure tridimensionnelle de la Salmosine est un hybride de Kistrine et d'Echistatine, qui sont des peptides inhibant l'agrégation plaquettaire connus dans l'état de la technique.

De plus, on a aussi démontré que la Salmosine inhibe l'agrégation plaquettaire d'une manière beaucoup plus efficace que tout autre peptide connu inhibant l'agrégation plaquettaire. Donc on propose que la Salmosine puisse être développée en tant qu'agent thérapeutique pour la maîtrise de la thrombose.

2736266

5

Dans la description de la séquence d'acides aminés des protéines et des peptides de la présente invention, on utilise les symboles abrégés à une lettre selon les normes IUPAC-IUB comme suit:

5

	<u>Acide aminé</u>	<u>Symbole</u>
	Alanine	A
	Arginine	R
10	Asparagine	N
	Acide aspartique	D
	Cystéine	C
	Glutamine	Q
	Acide Glutamique	E
15	Glycine	G
	Histidine	H
	Isoleucine	I
	Leucine	L
	Lysine	K
20	Méthionine	M
	Phénylalanine	F
	Proline	P
	Sérine	S
	Thréonine	T
25	Tryptophane	W
	Tyrosine	Y
	Valine	V

La présente invention est, de plus, illustrée dans les exemples suivants qui ne doivent pas être pris comme limitant le champ de l'invention.

Exemple 1: Purification de la Salmosine

On a dilué d'un facteur 10, 1 ml de venin obtenu à partir de Agkistrodon halys brevicaudus avec Tris-HCl 20

2736266

6

mM (pH 7,5). On a chargé le diluant sur une colonne benzamidine-Sepharose (Pharmacia-LKB, Suède) (2,5 x 10 cm) prééquilibrée avec le Tris-HCl 20mM (pH 7,5) avec un débit de 30 ml/h. Puis, on a recueilli la solution ayant traversé la colonne sans se lier et on l'a appliquée sur une colonne DEAE-Toyopearl (Pharmacia, Suède) (2,5 x 5,0 cm) à un débit de 60 ml/h, et on l'a éluée avec un gradient de concentration saline de NaCl par paliers (20 mM, 50 mM, 100 mM et 1 M). On a réuni et on a concentré les fractions actives en utilisant un système d'ultrafiltration (Modèle 8 200, Amicon, USA). On a chargé le concentrat ainsi préparé sur une colonne CLHP TSK G2000 (Toyosoda, Japon) (7,5 x 300 mm) à un débit de 60 ml/h et on a effectué une élution. On a réuni et on a concentré les fractions actives en utilisant un système d'ultrafiltration (Centriprep-3, Amicon, USA).

On a ensuite appliqué les fractions actives ainsi concentrées sur une colonne CLHP à phase inverse Vydac C₁₈ (Vydac, USA) (2,5 x 300 mm) équilibrée avec TFA (acide trifluoroacétique) 0,1% (v/v), lavées avec TFA 0,1% (v/v) et avec de l'acétonitrile 20% (v/v) d'une manière séquentielle, et éluées avec un gradient linéaire de concentration d'acétonitrile de 20% à 60% (v/v). On a élué la Salmosine avec un temps de rétention de 31,8 minutes.

On a dosé l'activité biologique de la Salmosine au cours de la purification selon le procédé ELISA comme suit: on a recouvert des plaques de microtitration ayant 98 puits avec du fibrinogène à 4°C pendant une nuit. Puis, on a fait réagir le fibrinogène avec le récepteur GPIIb-IIIa isolé à partir de plaquettes humaines et avec des solutions contenant la Salmosine à température ambiante pendant 2 heures. Après lavage avec un tampon de Tris-HCl 20mM (pH 7,5 contenant NaCl 0,15 M, 0,05% de Tween 20 et 0,02% de NaN₃), on a fait réagir les

2736266

7

plaquettes avec un anticorps de souris GPIIIa antihumain (Tagoimmunologicals, Biosource International, USA) pendant 2 heures, on a lavé trois fois avec le même tampon et on a fait réagir ensuite avec IgG-HRP (peroxydase de raifort) antisouris de chèvre (Tagoimmunologicals, Biosource International, USA) pendant 1 heure. Après 3 lavages avec le tampon, on a ajouté un substrat chromogène, la o-phénylènediamine, et on a mesuré l'absorbance à 490 nm.

10

Exemple 2: Détermination de la pureté de la Salmosine

Pour déterminer la pureté de la Salmosine préparée dans l'exemple 1, on a traité la solution de Salmosine éluée par chromatographie CLHP à phase inverse C_{18} avec 100% de TCA (acide trichloroacétique) afin de précipiter la Salmosine, et on a mis en suspension la Salmosine avec un volume de Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8, contenant 4% (p/v) de SDS, 2% (v/v) de glycérol et 10% (v/v) de mercaptoéthanol), et on a laissé incuber à 100°C pendant 5 minutes. On a analysé la Salmosine ainsi préparée sur SDS-PAGE en utilisant un gel à 18% de Tris-glycine (Novex, USA) et on a effectué une coloration au nitrate d'argent (voir: figure 1). Sur la figure 1, la colonne 1 est la Salmosine préparée dans l'exemple 1, et la colonne 2 représente les marqueurs de masses moléculaires. Tel que présenté dans la figure 1, le spectre SDS-PAGE laisse voir une seule bande de Salmosine. En conséquence, il est clairement démontré que l'on a isolé la Salmosine à partir du venin de (Agkistrodon halys brevicaudus) dans une forme pure.

30

Exemple 3: Analyse des séquences d'acides-amino de la Salmosine

On a fait digérer la Salmosine purifiée par CNBr et on a déterminé sa séquence d'acides-amino en utilisant un

35

2736266

8

analyseur automatique de séquence d'acides aminés. On présente à la figure 2 les séquences d'acides aminés de la Salmosine et plusieurs peptides connus inhibant l'agrégation plaquettaire (SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 5). Sur la figure 2, le soulignement indique des acides aminés distincts l'un de l'autre, lorsqu'on les compare à l'Halysine (voir: Huang et al., Biochem. Pharmacol., 42: 1 209 à 1 219 (1991a)), peptide connu inhibant l'agrégation plaquettaire isolé à partir du venin d'une vipère japonaise, Mamushi (Agkistrodon halys), qui, sur le plan de la taxinomie, est identique en termes d'espèces à une vipère coréenne, Salmosa (Agkistrodon halys brevicaudus). Comme il est montré sur la figure 2, la Salmosine est un nouveau peptide inhibant l'agrégation plaquettaire, qui a une séquence d'acides aminés différente de celle des peptides inhibiteurs connus.

Exemple 4: Détermination de la masse moléculaire de la Salmosine

On a déterminé que la valeur de la masse moléculaire de la Salmosine est égale à 7 473,6 Da au moyen de MALDI-MS (spectrométrie de masse à ionisation par désorption de matrice au moyen de laser, Kratos Kompact Mold II, Kratos Analytical, Manchester, Royaume Uni) (Voir: figure 3).

Exemple 5: Analyse de la structure tri-dimensionnelle de la Salmosine

A partir de la séquence d'acides aminés de la Salmosine déterminée dans l'exemple 3, on a analysé la structure tri-dimensionnelle de la Salmosine au moyen d'un système de modélisation par ordinateur qui utilise Indigo2-X2 (Silicon Graphics Corp., USA) et Insight II/Discover and Homology (Biosym. Corp., USA), en tant que matériel et logiciel, respectivement. L'analyse par

2736266

9

modélisation à l'ordinateur enseigne que la structure tri-dimensionnelle de la Salmosine est un hybride de la Kistrine et de L'Echistatine, qui sont des peptides inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire déjà connus dans l'état de la technique.

Exemple 6: Comparaison de l'activité d'inhibition de l'agrégation plaquettaire

Afin de comparer les activités de la Salmosine et les peptides connus inhibant l'agrégation plaquettaire, on a mesuré l'activité d'inhibition de l'agrégation plaquettaire au moyen de deux procédés différents comme suit:

- (1) Le procédé ELISA de l'exemple 1
- (2) Le dosage d'agrégation plaquettaire humaine:
On a mélangé 225 μ l de plasma humain riche en plaquettes (3×10^5 plaquettes/ μ l de plasma) avec 25 μ l de peptide inhibant l'agrégation plaquettaire dans du PBS (0,1 μ g/ml) et on l'a incubé dans un Agrégomètre (Chromo-Log Corp., USA) à 25°C pendant 5 minutes, et on a mesuré la turbidité après l'addition d'un agent d'agrégation, à savoir, l'ADP.

On a présenté dans le tableau 1 les activités d'inhibition de l'agrégation plaquettaire de la Salmosine et des peptides connus inhibant l'agrégation plaquettaire, à savoir, Kistrine, γ -Trigramine (voir: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87: 2 471 (1989)), Echistatine et un peptide synthétique (GRGDSP), mesurées au moyen des procédés décrits ci-dessus. Comme on peut le constater dans le tableau 1, il est clairement démontré que la Salmosine a une activité d'inhibition d'agrégation plaquettaire supérieure à tout inhibiteur d'agrégation plaquettaire connu.

2736266

10

Tableau 1: Comparaison de l'activité d'inhibition de l'agrégation plaquettaire		
Peptide inhibant l'agrégation plaquettaire	IC ₅₀ (nM)	
	Procédé ELISA	Dosage d'agrégation plaquettaire humaine
Kistrine	2,7	128
γ -Trigramine	2,2	240
Echistatine *	2,7	560
Salmosine	0,7	50
GRGDSP*	300	230 000
* peptide synthétique dont la séquence d'acides aminés est Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro.		

Tel qu'il est illustré et démontré clairement ci-dessus, la présente invention fournit un nouveau peptide
 5 inhibant l'agrégation plaquettaire, à savoir la Salmosine et un procédé pour préparer celle-ci à partir du venin d'une vipère coréenne, *Salmosia* (*Agkistrodon halys brevicaudus*). La Salmosine inhibe l'agrégation plaquettaire d'une manière plus efficace que tout autre
 10 peptide connu inhibiteur d'agrégation plaquettaire. On suggère que la Salmosine peut être développée en tant qu'agent thérapeutique pour la maîtrise de la thrombose.

2736266

11

REVENDICATIONS

1. Peptide (Salmosine) inhibiteur d'agrégation
plaquettaire, provenant du venin de Salmosa (Aqkistrodon
5 halys brevicaudus), qui est constitué de la séquence
d'acides aminés représentée par (SEQ ID N°: 1):

EAGEE CDCGS PGNPC CDAAT CKLRQ GAQCA EGLCC DQCRF40
MKEGT ICRRA RGDDL DDYCN GISAG CPRNP FHA 73

10

2. Procédé pour la préparation du peptide
(Salmosine) inhibant l'agrégation plaquettaire selon la
revendication 1 à partir du venin de Salmosa (Aqkistrodon
halys brevicaudus), qui comprend les étapes consistant: à
15 obtenir le venin de Salmosa; à charger le venin sur une
colonne d'affinité à sérine-protéinase afin de recueillir
la solution ayant traversé la colonne sans se lier; et à
soumettre la solution à une série d'opérations, d'échange
anionique, de filtration sur gel et de chromatographies
20 CLHP en colonne à phase inverse.

1/3

2736266

1

2

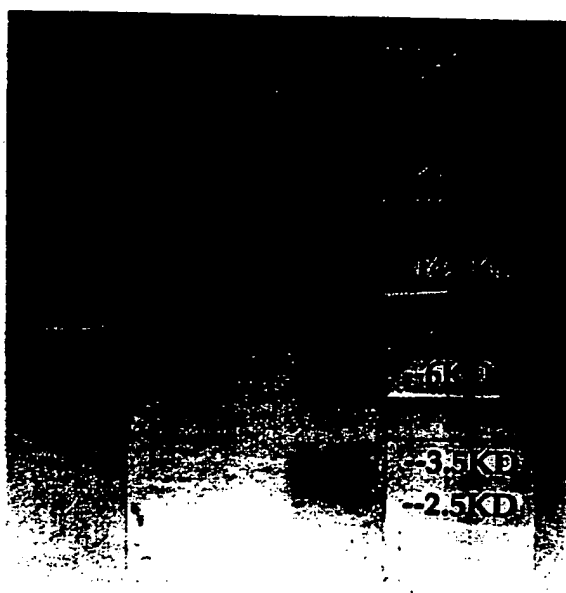


Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

2736266

2/3

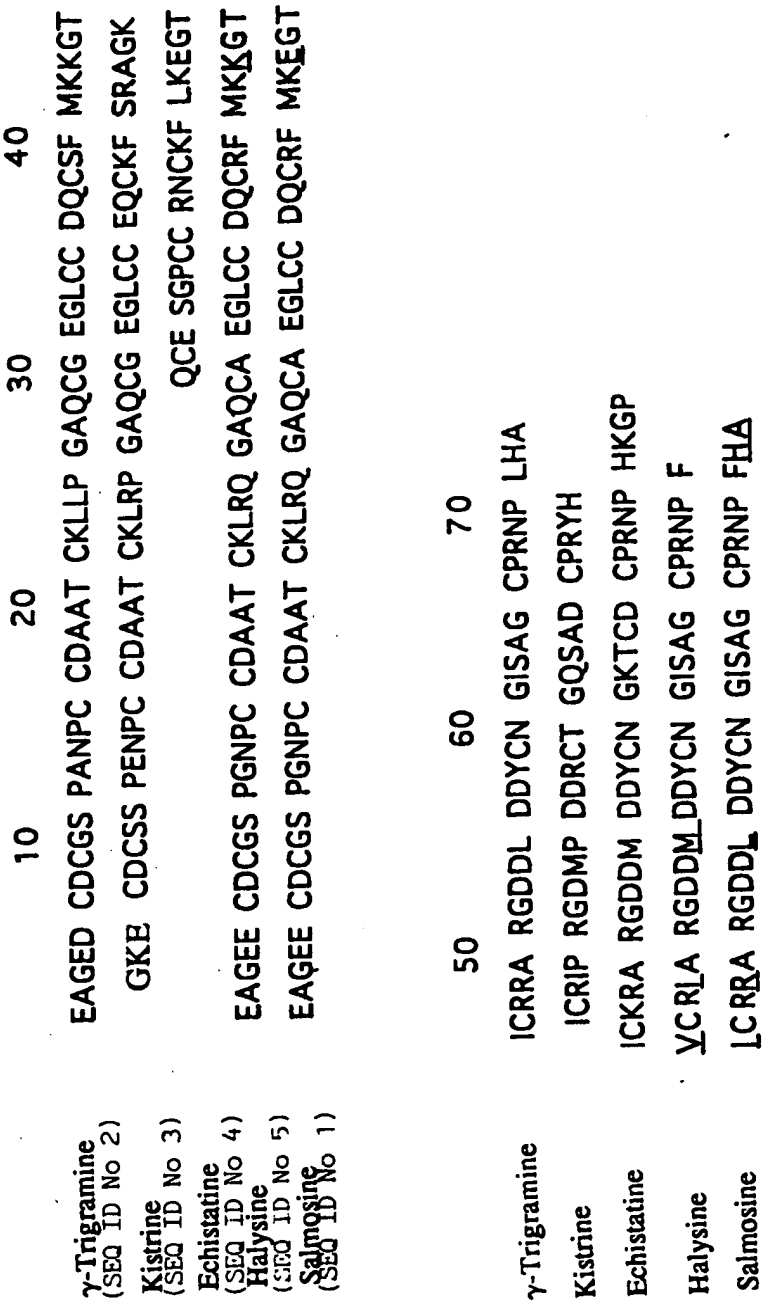


Figure 2

2736266

3/3

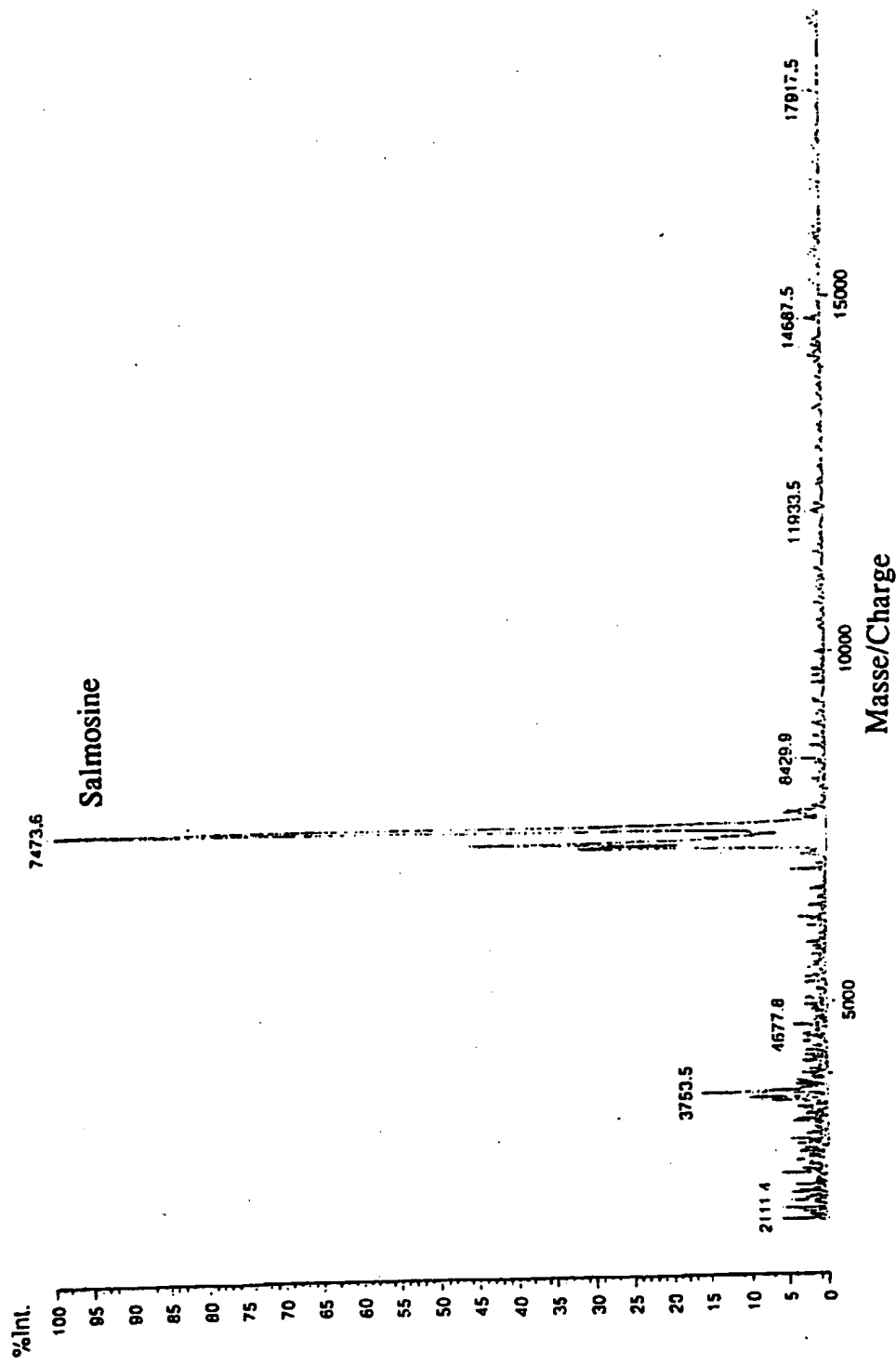


Figure 3

BEST AVAILABLE COPY